

发酵法岩藻多糖的硫酸化及其抗氧化活性研究^①

谢爱卿¹, 杨海川², 徐兴然¹, 邹祥¹

1. 西南大学 药学院, 重庆 400715; 2. 重庆药友制药有限责任公司, 重庆 401121

摘要: 岩藻多糖在抗氧化、抗肿瘤和抗病毒方面具有广泛的生物活性, 但其在褐藻中含量低且产量少. 微生物来源的岩藻多糖与海藻来源的岩藻多糖具有类似的分子结构, 但其生理活性不足. 本研究对发酵法生产的岩藻多糖进行硫酸化改性以增强其抗氧化活性, 使其成为一种可选的岩藻多糖替代品, 采用氯磺酸-吡啶法进行硫酸化修饰, 红外光谱和核磁氢谱结果显示硫酸基修饰成功, 硫酸基含量为 28.2%; 硫酸化岩藻糖多糖羟基自由基清除率可达 81.61%, 超氧阴离子清除率可达 93.06%; 细胞试验表明硫酸化岩藻多糖在 50 $\mu\text{g/mL}$ 及以下无细胞毒性, 且低质量浓度(5 $\mu\text{g/mL}$)下即可对 RAW 264.7 细胞氧化损伤具有保护作用.

关键词: 岩藻多糖; 硫酸化; 抗氧化; 微生物多糖; 结构验证

中图分类号: Q939.9; TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2023)02-0065-08

On Sulfated Modification and Anti-oxidant Activity of Fucose-Containing Exopolysaccharide from Microbial Fermentation

XIE Aiqing¹, YANG Haichuan², XU Xingran¹, ZOU Xiang¹

1. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Yaopharma Co., Ltd., Chongqing 401121, China

Abstract: Fucoidan has a wide range of biological activities in antioxidant, antitumor and antiviral, whereas its content and yield are low in brown algae resources. Compared to fucoidan, fucose-containing exopolysaccharide(FucoPol) from microbial fermentation have similar molecular structures, but lower physiological activity. In this study, fucose-containing polysaccharides was modified by sulfate in order to enhance its antioxidant activity. After sulfidation modification by chlorosulfonic acid-pyridine method, the results of IR and ¹HNMR showed that the sulfate group was successfully added, and the content of sulfate group in sulfated FucoPol reached 28.2%; The sulfated fucose-containing exopolysaccharide hydroxyl radical scavenging ability reached 81.61%, and superoxide anions scavenging ability reached 93.06%; Sulfated FucoPol has no obvious cytotoxicity in test concentration, and it can protect RAW 264.7 cells from oxidative damage at low concentration (5 $\mu\text{g/mL}$). Sulfated fucose-containing exopolysaccharide can be used as

① 收稿日期: 2022-06-20

基金项目: 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2016shmszx0184).

作者简介: 谢爱卿, 硕士研究生, 主要从事微生物多糖的研究.

通信作者: 邹祥, 教授, 博士生导师.

an alternative substitute of fucoidan.

Key words: fucoidan; sulfation; antioxidant; microbial polysaccharides; structural verification

岩藻多糖(fucoidan),也被称为褐藻糖胶,是一种由岩藻糖硫酸酯构成的水溶性多糖,具有广泛的生物活性,如抗氧化、抗病毒及抑制幽门螺旋杆菌等^[1].岩藻多糖在褐藻中的含量低(大约 0.1%),存在提取工艺复杂、提取率低等限制,从而对岩藻多糖生理活性的研究和应用开发^[2].微生物来源的岩藻多糖主要是指含岩藻糖胞外多糖(fucose-containing exopolysaccharide, FucoPol),产 FucoPol 菌株主要来源于肠杆菌属和芽孢杆菌属^[3].FucoPol 的分子结构中不含硫酸基,导致其生物活性不足^[4],但其优势是可以通过基因工程改造和发酵工艺优化等手段来提升产量,实现大规模工业化生产.

多糖硫酸化修饰是一种通过化学法在多糖的分子链上接枝硫酸基团的方法.硫酸化修饰可以增强原多糖的某些活性或产生新的生物活性,如免疫活性、抗病毒活性及抗菌活性等,其中抗氧化活性的增强备受研究者关注.Xu 等^[5]对黑加仑多糖进行硫酸化修饰,体外实验表明硫酸化黑加仑多糖比黑加仑多糖具有更强的抗氧化活性和 α -淀粉酶抑制活性;Liu 等^[6]对梭柄松苞菇子实体多糖(mCVP-1S)进行硫酸化改性,发现硫酸化实体多糖具有更好的体外抗氧化活性及抗凝血活性,并发现取代度和三螺旋结构是影响其生物活性的重要因素;Zhang 等^[7]发现硫酸化植物乳杆菌胞外多糖显示出比原始胞外多糖更强的自由基清除活性,硫酸化胞外多糖可以保护 Caco-2 细胞免受蜡状芽孢杆菌肠毒素引起的损伤.

本研究以本课题组筛选的 *Kosakonia* sp. CCTCC M2018092 菌株发酵产生的 FucoPol 为原料^[8],通过化学法进行硫酸化修饰,在分子结构中引入硫酸基团,并对硫酸化 FucoPol(FucoPol-S)进行红外和核磁表征,测定硫酸基含量,以及体外抗氧化活性及细胞相容性,为实现 FucoPol 的应用开发奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试剂

FucoPol 由 *Kosakonia* sp. CCTCC M2018092 菌株发酵产生;Fucoidan,上海麦克林生化科技有限公司;氯磺酸、吡啶、硫酸亚铁、过氧化氢溶液、氯化硝基四氮唑蓝、 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和吩噻硫酸甲酯均为分析纯,上海易恩化学技术有限公司;胎牛血清、DMEM 培养基、100 $\times$ 青霉素-链霉素溶液,重庆睿宸生物科技有限公司.

1.2 仪器与设备

TGL-16M 型台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器有限公司;600 MHz 核磁共振波谱仪,瑞士布鲁克仪器有限公司;Synergy H1 型酶标仪,美国安捷伦科技有限公司.

1.3 细胞和菌株

小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 细胞株, *Kosakonia* sp. CCTCC M2018092 菌株由本实验室保存.

1.4 实验方法

1.4.1 胞外多糖制备及分离提取

参考 Li 等^[9]方法进行 FucoPol 的发酵和分离提取. *Kosakonia* sp. CCTCC M2018092 菌株首先在 250 mL 锥形瓶中培养活化 20 h,菌液转移到 15 L 种子罐中预培养 13 h,预生长的种子液转移到 50 L 发酵罐中进行分批补料发酵 96 h.

发酵结束后,发酵液进行部分酸水解降低粘度以便于进行后续的分离提纯.发酵液使用浓硫酸调节 pH 值至 2.0,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 4 h.使用陶瓷膜过滤除去发酵液中的菌体和不溶性杂质.使用截留分子量为 10 000 g/mol 的高分子膜进行超滤以进一步去除小分子杂质.接着,通过 Sevag 法脱蛋白,最后通过透析(截留分子量 8 000 g/mol)和冻干得到 FucoPol.

1.4.2 硫酸化多糖制备

采用氯磺酸-吡啶法进行 FucoPol 的硫酸化^[10].在磁力搅拌和冰水浴冷却的条件下,将 6 mL 氯磺酸通

过恒压滴液漏斗缓慢加入 12 mL 无水吡啶中,在 40 min 内滴加完成,得到淡黄色固体状硫酸化试剂。

将 500 mg FucoPol 粉末加入 20 mL 甲酰胺,于室温下磁力搅拌分散 30 min. 加入硫酸化试剂,于 50 ℃ 反应 2 h. 冷却至室温,使用 4 mol/L NaOH 溶液调整反应液的 pH 值至 7.0 左右,使用 3 倍体积乙醇沉淀硫酸化多糖. 5000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液,使用去离子水溶解沉淀,流水透析(截留分子量 3 500 g/mol)12 h,去离子水中透析 24 h. 透析液冻干后得硫酸化多糖(FucoPol-S)。

1.4.3 硫酸化修饰验证

通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)和核磁氢谱(^1H NMR)进行结构表征. 制备的硫酸化多糖样品使用常规方法压片,采用傅里叶变换红外光谱仪扫描分析(扫描范围 400~4 000 cm^{-1});取 5 mg 干燥的多糖样品溶解于 0.5 mL 氘代水中,内标为 TMS,进行 ^1H NMR 分析。

硫酸化多糖中的硫酸根含量采用比浊法^[11]测定. 将 3 mg FucoPol-S 溶解于 5 mL 1 mol/L HCl 中,压盖密封后于 100 ℃ 水解 6 h,水解液冷却至室温后过滤除去沉淀备用. 分别取 1.48 mg/mL 的硫酸钠标准溶液(SO_4^{2-} 质量浓度为 1.00 mg/mL)0.04,0.06,0.08,0.10,0.12,0.14,0.16 mL,使用 1 mol/L 盐酸补齐至 0.20 mL. 向其中加入 3.8 mL 3%三氯乙酸溶液和 1.0 mL 氯化钡-明胶溶液(含 0.5%明胶和 0.5%氯化钡),混匀后室温静置 15 min,在 360 nm 波长测定吸光度值 A_1 . 以 0.5%明胶溶液代替明胶-氯化钡溶液作为空白,测吸光度值 A_2 ,以吸光度差值($A_1 - A_2$)和硫酸基质量分数作标准曲线. 取 0.20 mL 硫酸化多糖水解液使用上述方法测吸光度值,使用标准曲线计算硫酸根质量. 使用以下公式计算硫酸化多糖中的硫酸基质量分数:

$$S = \frac{m_2}{m_1} \times 100\%$$

式中: S 为硫酸化多糖中的硫酸基质量分数; m_2 为硫酸根质量,单位为 mg; m_1 为硫酸化多糖质量,单位为 mg。

1.4.4 羟基自由基清除活性测定

参考 Chen 等^[12]的方法测定岩藻多糖、FucoPol-S 和 FucoPol 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性. 使用去离子水配制不同浓度的样品溶液. 在 96 孔板中,将 160 μL 样品溶液与 40 μL 9 mmol/L FeSO_4 溶液和 40 μL 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液充分混合,再加入 20 μL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液. 混合均匀后,于 37 ℃ 静置 30 min,并于酶标仪上测定 510 nm 处吸光度. 维生素 C(Vc)作为阳性对照,以去离子水替代多糖溶液作为空白,每组设置 3 个重复孔. 计算 $\cdot\text{OH}$ 清除率:

$$Y_1 = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中: Y_1 为 $\cdot\text{OH}$ 清除率; A_0 为空白孔吸光度; A_1 为样品孔吸光度。

1.4.5 超氧阴离子清除活性测定

参考 Lin 等^[13]的方法测定岩藻多糖、FucoPol-S 和 FucoPol 的超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)清除活性. 使用去离子水配制不同浓度的多糖溶液. 在 96 孔板中,将 50 μL 多糖溶液与 100 μL 150 $\mu\text{mol/L}$ 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)溶液和 100 μL 470 $\mu\text{mol/L}$ β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β -NADH)溶液混合均匀,再加入 20 μL 20 $\mu\text{mol/L}$ 吩嗪硫酸甲酯(PMS)溶液. 混合均匀后,在室温下静置 5 min,并于酶标仪上测定 560 nm 处吸光度. Vc 作为阳性对照,以去离子水替代多糖溶液作为空白,每组设置 3 个重复孔. 计算超氧阴离子自由基清除率:

$$Y_2 = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中: Y_2 为超氧阴离子清除率; A_0 为空白孔吸光度; A_1 为样品孔吸光度。

1.4.6 细胞毒性测定

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞在完全培养基(补充有 100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 10%胎

牛血清的 DMEM 培养基)中生长,并在 37 ℃,5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。

通过 CCK-8 试剂盒测定 FucoPol-S 对 RAW264.7 细胞的细胞毒性^[14-15]. 在 96 孔板中接种 100 μL 稀释至 5.0×10⁴ 个/mL 的细胞,每组设 6 个重复孔. 培养 12 h 后,弃去原培养基,分别用 100 μL 以完全培养基溶解的 FucoPol-S(12.5 μg/mL 至 50 μg/mL)处理细胞 24 h. 将多糖溶液替换为等体积完全培养基作为空白组. 随后,向每个孔中加入 10% CCK-8 溶液,于 37 ℃ 孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度. 计算细胞活力:

$$V = \frac{A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中: V 为细胞活力; A_0 为空白组吸光度; A_1 为多糖实验组吸光度。

1.4.7 细胞抗氧化活性测定

参考邹灵秀等^[16]的方法进行细胞氧化损伤模型构建. 在 96 孔板中接种 100 μL 以完全培养基稀释至 5.0×10⁴ 个/mL 的 RAW 264.7 细胞,每组设 6 个重复孔. 培养 12 h,弃去原培养基,用 100 μL DMEM 培养基稀释的不同浓度 H₂O₂(0~900 μmol/L)处理细胞 12 h. 随后,向每个孔中加入 10% CCK-8 溶液,于 37 ℃ 孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度. 计算细胞活力。

参考 Zhang 等^[17]的方法进行细胞抗氧化实验. 在 96 孔板中接种 100 μL 以完全培养基稀释至 5.0×10⁴ cell/mL 的 RAW 264.7 细胞,每组设 6 个重复孔. 培养 12 h,弃去原培养基,实验组用 100 μL 完全培养基稀释的不同质量浓度的 FucoPol-S(0.5~50 μg/mL)和岩藻多糖(0.5~50 μg/mL)处理细胞 24 h. 随后,加入 100 μL 1.5 mmol/L DMEM 培养基稀释的 H₂O₂ 溶液,培养 12 h. 空白组以等体积完全培养基替代多糖溶液,等体积 DMEM 培养基替代过氧化氢溶液. 过氧化氢对照组以等体积完全培养基替代多糖溶液. 最后,向每孔加入 10% CCK-8 溶液,于 37 ℃ 孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度. 计算细胞活力。

1.4.8 数据统计分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制实验数据相关图片. 实验结果是 3 次及以上分析的平均值,使用 SPSS 18.0 软件进行数据显著性分析, $p < 0.05$ 表示数据差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 硫酸化修饰验证

发酵液经酸水解、膜过滤、透析冻干后得到 FucoPol. 500 mg FucoPol 硫酸化得到 558 mg FucoPol-S, 产率 111.6%(图 1). 通过比浊法在 FucoPol 中未检测到硫酸基存在,而测得 FucoPol-S 和岩藻多糖硫酸基含量分别为 28.2%,20.7%。

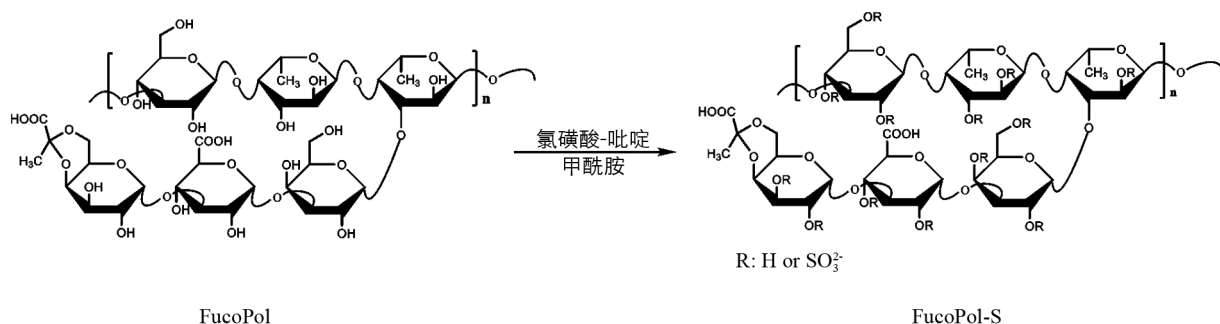


图 1 FucoPol 硫酸化修饰反应

在 FucoPol-S 的 FT-IR 光谱中出现了硫酸基团的特征吸收带, 1 258 cm⁻¹附近的条带归属于不对称 S=O 双键的伸缩振动, 证明硫酸基团成功引入^[17]. 800~850 cm⁻¹左右的吸收带由 C-O-S 对称振动引起,

该范围的红外吸收可用来推断硫酸基团在硫酸化多糖中的取代位置, 在含半乳糖单元的多糖中 845 cm^{-1} , 830 cm^{-1} 和 820 cm^{-1} 位置的条带分别分配给的 C-4 硫酸化、C-2 硫酸化和 C-6 硫酸化^[18]. FucoPol-S 的红外光谱中在 808 cm^{-1} 和 832 cm^{-1} 出现了吸收峰, 可以推断 FucoPol 的硫酸化主要发生在 C-6 和 C-2 位置(图 2).

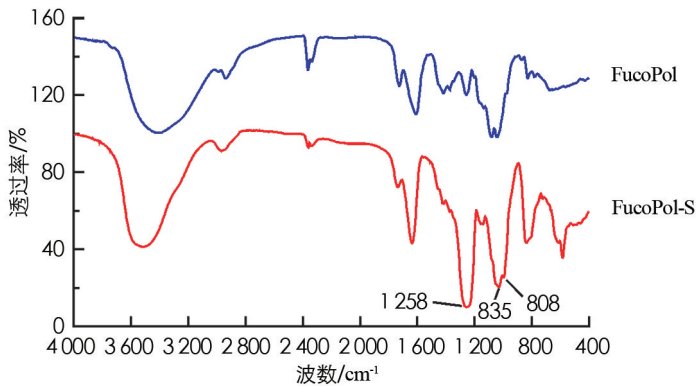


图 2 FucoPol 和 FucoPol-S FT-IR 光谱图

在 FucoPol-S 的 ^1H NMR 图中, 归属于岩藻糖甲基的质子峰化学位移值向低场移动(由 1.29 移至 1.44), 提示在岩藻糖单元上发生了硫酸化修饰^[19]. 而化学位移 3.2~4.6 之间归属于岩藻糖、葡萄糖、半乳糖和葡萄糖醛酸的质子峰都整体向低场方向发生了移动, 说明硫酸化修饰随机发生在各个单糖单元的羟基上.

2.2 自由基清除活性

羟基自由基($\cdot\text{OH}$)是人体内存在的活性氧之一, 其能轻易地穿过细胞膜并与碳水化合物、蛋白质和 DNA 等生物大分子发生反应, 是导致细胞氧化损伤的主要原因. 因此, 减少 $\cdot\text{OH}$ 对于人体健康具有重要意义. 采用 Fenton 试剂产生 $\cdot\text{OH}$, 测定岩藻多糖、FucoPol-S 和 FucoPol 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除活性(图 3). 3 种多糖的 $\cdot\text{OH}$ 清除率具有浓度依耐性, 半数抑制质量浓度分别为 IC_{50} (岩藻多糖) = 0.67 mg/mL ; IC_{50} (FucoPol-S) = 1.82 mg/mL ; IC_{50} (FucoPol) > 8.00 mg/mL . 当质量浓度增达到 8.0 mg/mL 时, FucoPol-S 的 $\cdot\text{OH}$ 清除率为 81.61% , 岩藻多糖的 $\cdot\text{OH}$ 清除率为 80.34% , 两者差异无统计学意义($p > 0.05$), FucoPol 的 $\cdot\text{OH}$ 清除率为 43.37% , 显著小于 FucoPol-S($p < 0.05$). 对比 FucoPol-S 和 FucoPol, 结果显示硫酸化修饰显著增强了岩藻多糖的 $\cdot\text{OH}$ 清除活性, 说明硫酸根在清除 $\cdot\text{OH}$ 中起重要作用. 对比 FucoPol-S 和岩藻多糖, 结果显示 FucoPol-S 的半数抑制质量浓度高于岩藻多糖, 但高质量浓度时两者 $\cdot\text{OH}$ 清除活性相当. Wang 等^[20]研究表明硫酸化多糖可能通过螯合 Fe^{2+} 来减少 $\cdot\text{OH}$ 的产生, 我们推测高取代度的硫酸化多糖中可用于螯合 Fe^{2+} 的羟基减少, 可能是高取代 FucoPol-S $\cdot\text{OH}$ 清除活性略低于 FucoPolan 的原因.

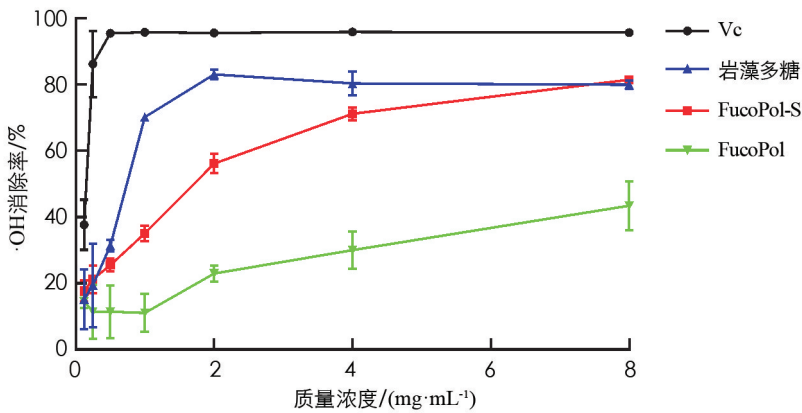


图 3 $\cdot\text{OH}$ 清除活性比较

超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)是单线态氧和羟基自由基的前体之一, 它会间接引发体内的氧化损伤. 通过 PMS/NADH/NBT 体系测定 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除活性(图 4). 结果显示 FucoPol-S 的 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除率随质量浓度增加迅速增加, 并在 0.25 mg/mL 时达到 93.06%, 效果与相同质量浓度的 Vc 相当, 在实验质量浓度(0.0625~2.00 mg/mL)范围内, 均显著高于 FucoPol 和 FucoPol-S. 其中 $IC_{50}(\text{FucoPol}) > 2.00\text{ mg/mL}$; $IC_{50}(\text{Fu-coidan}) > 2.00\text{ mg/mL}$; $IC_{50}(\text{FucoPol-S}) = 0.073\text{ mg/mL}$. Chen 等^[21]研究表明清除 $\cdot\text{O}_2^-$ 的机理可能与 O—H 键能有关, 即多糖上带有的吸电子基团数越多, O—H 键能越弱, O—H 键越容易解离出氢原子, 从而稳定 $\cdot\text{O}_2^-$.

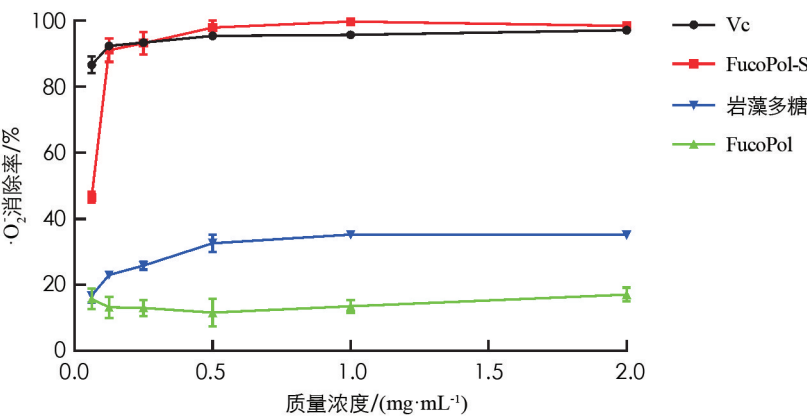


图 4 O_2^- 清除活性比较

2.3 细胞抗氧化实验结果

使用不同质量浓度的 FucoPol-S 处理 RAW 264.7 细胞 24h 后, 结果显示 50 $\mu\text{g/mL}$ 及以下均未显示出细胞毒性, 说明 FucoPol-S 具有较好的生物安全性(图 5).

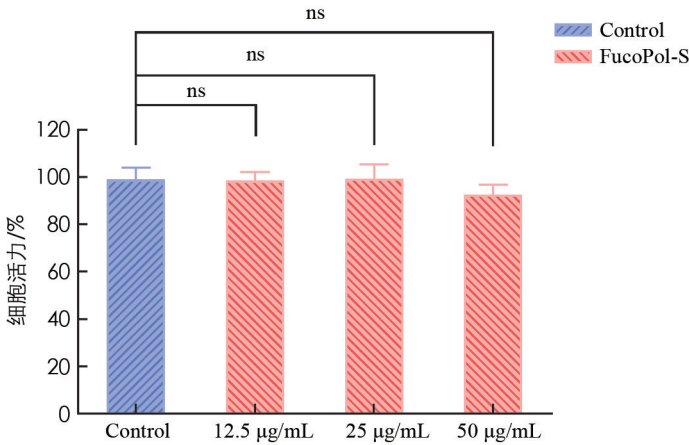


图 5 FucoPol-S 对 RAW 264.7 细胞的毒性实验

用浓度递增的过氧化氢溶液处理 RAW 264.7 细胞 12 h 后, 其细胞活力逐渐降低, 当过氧化氢浓度达到 0.9 mmol/L 时, 细胞活力降至 25.59%. 其中, 当浓度为 0.7 mmol/L 时, 细胞活力为 54.86%. 基于该结果, 后续实验将使用 0.7 mmol/L 过氧化氢处理 12 h 作为细胞氧化损伤条件.

细胞抗氧化实验中, 比较了不同质量浓度的 FucoPol-S 和岩藻多糖对过氧化氢诱导的 RAW 264.7 细胞活力丧失的保护作用(图 6). 结果显示, 当使用 5 $\mu\text{g/mL}$ FucoPol-S 或 50 $\mu\text{g/mL}$ 岩藻多糖时, 均能显著的提升细胞活力, 其中 FucoPol-S 以更高质量浓度达到和岩藻多糖相当的保护作用. 据报道, 细胞抗氧化能力与硫酸化多糖自由基清除活性高度相关^[22], FucoPol-S 在低质量浓度表现出细胞抗氧化活性可能与其较低的超氧阴离子半数抑制质量浓度有关. 同时注意到, 当 FucoPol-S 质量浓度进一步增加时, 细胞活力再度降低, 这可能与高质量浓度抗氧化物质导致细胞中的负反馈调节有关.

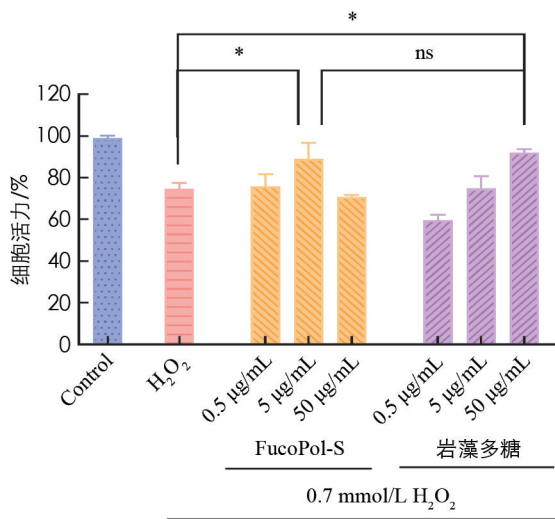


图 6 FucoPol-S 和 FucoPol 对 H₂O₂ 处理的 RAW 264.7 细胞活力影响

3 结论

以 *Kosakonia* sp. CCTCC M2018092 菌株发酵产生的 FucoPol 为原料, 采用氯磺酸-吡啶法进行硫酸化改性, 制备了一种硫酸基含量为 28.2% 的硫酸化岩藻多糖, 硫酸基团在各单糖单元的醇羟基上均有分布. 使用非选择性硫酸化方法, 大多数硫酸根基团与多糖中空间位阻较小的 C-6 伯羟基相连, 硫酸基接枝位置对生物活性也具有一定的影响^[23]. 硫酸化修饰往往能增强多糖的抗氧化活性^[24], 可能的机制是在多糖分子中引入硫酸基团引起 O-H 键的解离能减弱, 增加硫酸化多糖的供氢能力^[25].

硫酸化修饰增强了 FucoPol-S 的自由基清除活性. FucoPol-S 较 FucoPol ·OH 清除率提升 88.17%, ·O₂⁻ 清除率提升 633.43%. 在实验浓度范围(0.062 5~2.00 mg/mL)内, FucoPol-S 超氧阴离子清除活性均高于 FucoPol, 且当质量浓度大于等于 0.25 mg/mL 时, 其清除活性与阳性对照 Vc 相当. 硫酸化后 FucoPol-S 抗氧化活性得到增强, 尤其在超氧阴离子清除方面具有媲美 Vc 的效果.

FucoPol-S 对细胞氧化损伤具有保护作用. 在进一步的细胞抗氧化实验中, FucoPol-S 显示出良好的细胞相容性, 并能显著减少过氧化氢诱导的 RAW 264.7 细胞活力降低, 且 FucoPol-S 能以低质量浓度(5 µg/mL)达到与高质量浓度岩藻多糖(50 µg/mL)相当的细胞抗氧化效果. 说明在低浓度下即可对细胞氧化损伤产生保护作用.

综上所述, 以发酵法经硫酸化修饰的 FucoPol-S 对比褐藻来源的 FucoPol 在超氧阴离子自由基清除及低浓度细胞抗氧化方面具有明显优势, 且原料具有廉价易得的优势, 在未来抗氧化功能食品及保健制品开发中具有广泛应用前景.

参考文献:

[1] WANG Y, XING M, CAO Q, et al. Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies [J]. Marine Drugs, 2019, 17(3): 183-200.

[2] YUAN Y, MACQUARRIE D. Microwave Assisted Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) from *Ascophyllum Nodosum* and Its Antioxidant Activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 129: 101-107.

[3] XIAO M S, REN X M, YU Y, et al. Fucose-Containing Bacterial Exopolysaccharides: Sources, Biological Activities, and Food Applications [J]. Food Chemistry, X, 2022, 13: 100233-1-100233-17.

[4] WANG Z, XIE J, SHEN M, et al. Sulfated Modification of Polysaccharides: Synthesis, Characterization and Bioactivities [J]. Trends in Food Science, 2018, 74: 147-157.

[5] XU Y, GAO Y, LIU F, et al. Sulfated Modification of the Polysaccharides from Blackcurrant and Their Antioxidant and α-Amylase Inhibitory Activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109: 1344-1354.

- [6] LIU Y, TANG Q, DUAN X, et al. Antioxidant and Anticoagulant Activities of Mycelia Polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* After Sulfated Modification [J]. Industrial Crops Products, 2018, 112: 53-60.
- [7] ZHANG Z, LIU Z, TAO X, et al. Characterization and Sulfated Modification of an Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and Its Biological Activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 153: 25-33.
- [8] 赵行, 韩定强, 邹祥, 等. 基于 CFD-PBM 的 50L 盐藻多糖发酵罐两相流模拟 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2021, 46(4): 114-121.
- [9] LI S S, XIA H Q, XIE A Q, et al. Structure of a Fucose-Rich Polysaccharide Derived from EPS Produced by *Kosakonia sp.* CCTCC M2018092 and Its Application in Antibacterial Film [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 159: 295-303.
- [10] JIN M, LU Z, HUANG M, et al. Sulfated Modification and Antioxidant Activity of Exopolysaccharides Produced by *Enterobacter cloacae* Z0206 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(4): 607-612.
- [11] AN Q, YE X, HAN Y, et al. Structure Analysis of Polysaccharides Purified from *Cyclocarya paliurus* with DEAE-Celulose and Its Antioxidant Activity in RAW264.7 Cells [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 604-615.
- [12] CHEN L, HUANG G. Antioxidant Activities of Phosphorylated Pumpkin Polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 125: 256-261.
- [13] LIN C, WANG C, CHANG S, et al. Antioxidative Activity of Polysaccharide Fractions Isolated from *Lycium Barbarum* Linnaeus [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 45(2): 146-151.
- [14] TANG J, DIAO P, SHU X H, et al. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: in Vitro Assessment and a Theoretical Model [J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 7039802-1-7039802-8.
- [15] LI Q, QIU Z, WANG Y, et al. Tea Polyphenols Alleviate Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress Damage Through the Mst/Nrf2 Axis and the Keap1/Nrf2/HO-1 Pathway in Murine RAW264.7 cells [J]. Experimental Therapeutic Medicine, 2021, 22(6): 1-10.
- [16] 邹灵秀, 陈湛, 杨小玲, 等. 白藜芦醇对兔成纤维细胞氧化应激损伤的保护作用研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(5): 51-56.
- [17] ZHANG Y, LIU P H, WANG C Y, et al. Homogalacturonan from Squash: Characterization and Tau-Binding Pattern of a Sulfated Derivative [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 285: 119250-1-119250-20.
- [18] MACIEL J, CHAVES L, SOUZA B, et al. Structural Characterization of Cold Extracted Fraction of Soluble Sulfated Polysaccharide from Red Seaweed *Gracilaria birdiae* [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(4): 559-565.
- [19] CIMINO P, BIFULCO G, CASAPULLO A, et al. Isolation and NMR Characterization of Rosacelose, a Novel Sulfated Polysaccharide from the Sponge *Mixylla rosacea* [J]. Carbohydrate Research, 2001, 334(1): 39-47.
- [20] WANG J L, GUO H, ZHANG J, et al. Sulfated Modification, Characterization and Structure-Antioxidant Relationships of *Artemisia sphaerocephala* Polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(4): 897-905.
- [21] CHEN R, LIU Z, ZHAO J, et al. Antioxidant and Immunobiological Activity of Water-Soluble Polysaccharide Fractions Purified from *Acanthopanax senticosu* [J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 434-440.
- [22] WANG Z J, XIE J H, KAN L J, et al. Sulfated Polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* Reduce H₂O₂-Induced Oxidative Stress in RAW264.7 cells [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 80: 410-417.
- [23] ALBAN S, SCHAUERTE A, FRANZ G. Synthesis and Structure-Activity Relationships of New Pullulan Sulfates [J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 47(3): 267-276.
- [24] HUANG L X, HUANG M, SHEN M Y, et al. Sulfated Modification Enhanced the Antioxidant Activity of *Mesona Chinensis* Benth Polysaccharide and Its Protective Effect on Cellular Oxidative Stress [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 136: 1000-1006.
- [25] WANG J Q, HU S Z, NIE S P, et al. Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 2016: 5692852-1-5692852-13.